

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H04086

研究課題名(和文) 運動の恩恵効果が骨格筋から分泌されるマイオカインによって媒介されることの証明

研究課題名(英文) Evidence that the beneficial effects of exercise are mediated by myokines secreted from skeletal muscle

研究代表者

藤井 宣晴 (FUJII, Nobuharu)

東京都立大学・人間健康科学研究科・教授

研究者番号：40509296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,600,000円

研究成果の概要(和文)： 独自に発見した3つの新規マイオカインの生理的役割を明らかにした。マイオカインAは、最も速筋特性の高いミオシン重鎖IIbを、本来はそれがほとんど存在しない腓腹筋において発現させる因子であった。R-spondin3は、タイプ1筋線維から分泌されるマイオカインで、筋の体性幹細胞であるサテライト細胞に作用し、タイプ1線維へと分化誘導させる遅筋化因子であった。血小板由来成長因子(PDGF)は、サテライト細胞に対しては増殖の促進を促し、筋幹細胞に関しては筋収縮時の発揮張力を高める、筋力増強因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイオカインは注目を集める一方で、研究に関しては歴史が浅く、知見の集積は十分ではない。そのような背景のなか、新規に3種類のマイオカインに関して、その生理的役割を明らかにしたことは、マイオカイン研究分野を確実に前進させたといえる。また、3つのマイオカイン全てが骨格筋の質を変容させる効果を有することから、ヒトへの応用も考えられる。筋線維タイプのような、筋の質に影響を与えるファクターは、加齢や疾病によって緩やかに変化することはあるが、基本は遺伝的に決定されており、後天的に変えることは難しいとされていた。本研究ではそれを劇的に変化させるマイオカインが発見されており、これが学術・社会的意義となる。

研究成果の概要(英文)： We have clarified the physiological roles of three novel myokines discovered by our research group. Myokine A is a factor that induces the expression of myosin heavy chain IIb, which has the highest fast-twitch properties, in the gastrocnemius muscle, where it is rarely present. R-spondin3, a myokine secreted from type 1 muscle fibers, acts on satellite cells, which are muscle somatic stem cells, and induces their differentiation into type 1 fibers. Platelet-derived growth factor (PDGF) was a muscle strength-enhancing factor that promotes the proliferation of satellite cells and increases the contraction tension of myotube during muscle contraction.

研究分野：運動分子生物学

キーワード：マイオカイン 骨格筋 R-spondin3 筋線維タイプ PDGF 筋力増強

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の疫学研究は、身体運動が驚くほど多様な医学的恩恵効果を全身の臓器にもたらすことを証明した。運動は、単に心身の健康を整える手段としてだけでなく、疾病の予防・治療の有効な方策として国際的にも強く推奨され始めた。しかし運動の効果がどのような機序によって生じるのかの科学的理解は深まっていない。それらが明らかになれば、「臨床的に有効性・安全性が保証された運動処方(運動療法プログラム)の確立」や「運動の効果を補強する薬品・食品の創製」などへ道を拓くことになり、到来しつつある超高齢社会が抱える諸問題の解決策(高騰する医療費の低減、高齢者要介護者数の抑制、健康寿命の延伸)として期待される。

(2) 運動の効果は全身の臓器におよぶが、その内容は臓器ごとに異なり、例えば膵臓機能の亢進は膵細胞の糖感受性亢進に起因し、アルツハイマー病の予防は脳のアミロイド斑および神経原線維変性の抑制に起因する。これらの効果を薬で得るには、膵臓に作用するものと脳に作用するものの計2種類を服用する必要があるが、身体運動の場合は筋肉を動かすという1種類のアクションで多数の効果を全身に得られる。これら「多様性」「全身性」という特徴は、運動効果の発生機序解明の重要なカギとなる。申請者らはこの点に注目し、「骨格筋から分泌された複数の生理活性因子(総称してマイオカイン; myo=筋, kine=作動物質)が、血流を介して全身に運ばれ、運動の多様な効果を各臓器に生じさせる」というマイオカイン仮説を提唱し、研究を進めてきた。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究グループが発見した3種の新規マイオカインの生理作用を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝子組み換えマウスの作製

マイオカインAを、骨格筋特異的に発現を誘導する $\beta$ -アクチン・プロモーターを使用した発現ベクターを作成した。発現ベクターは線状化して、マウスの前核期受精卵に注入した。注入から遺伝子組み換えマウスを得るまでの過程は、トランスジェニック社(<http://www.transgenic.co.jp>)の協力を得た。R-spondin3および血小板由来成長因子(PDGF)の発現抑制マウスの作製のために、標的エクソンをCreリコンビナーゼ標的配列IoxPで挟んだターゲティング・ベクターを作成した。それ以降の過程はトランスジェニック社の協力を得た。すなわち、ベクターを導入し樹立したES細胞クローンでキメラ・マウスを作製した。 $\beta$ -アクチン・プロモーターで骨格筋特異的にCreリコンビナーゼを発現させたマウス(東京都立大学・藤井保有)と交配させ、骨格筋特異的な発現抑制マウスを得た。

(2) 基礎データの測定

発現量の確認; 遺伝子操作したマイオカインの発現量を、筋以外の臓器でも定量し、操作の結果が骨格筋のみで生じていることを確認した。さらに、血中濃度の変化から確認し、遠隔の臓器に影響を与えるタイプのマイオカインかどうかの判断材料とした。(B) 生理的パラメータの測定; 2週間ごとに、体長、体重、摂食量を測定した。また、血液プロフィール、トレッドミル走能力、握力、糖耐能、行動量、呼吸商、消費エネルギー量、を測定した。

(3) 骨格筋の解析

以下の項目を解析した。筋組織標本で筋組織形態(HE染色と免疫組織染色)、摘出骨格筋を用いた筋収縮力・糖輸送能・糖代謝・脂質代謝、筋衛星細胞の増殖能・分化能・筋管の収縮力、筋損傷モデルによる回復能力(in vivoでのカルジオトキシン筋注射)、尾部懸垂による筋萎縮に対する抵抗性。

## 4. 研究成果

(1) マイオカインA

(A) 骨格筋に速筋タイプの筋細胞が出現(図1); 骨格筋の特徴は、発揮張力は強いが疲労しやすい速筋タイプの細胞と、張力は弱い疲労耐性に勝る遅筋タイプの細胞の、構成比率で決まる。この比率は、病気や加齢によって緩やかに変化するが、基本は遺伝的に決まっていて、発現量をコントロールする因子や方法は見出されていない。しかしマイオカインA過剰発現マウスの骨格筋では、速筋タイプ細胞が増えており、そのタイプがほとんどないはずの腓腹筋でさえ、それが観察された。この結果は、

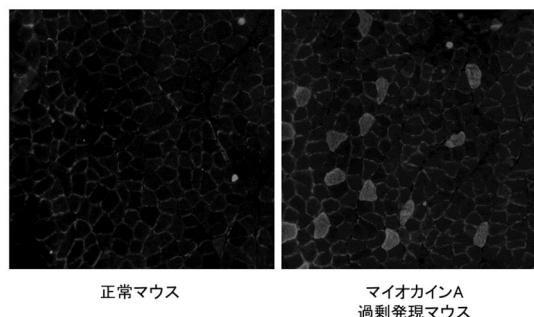


図1 マイオカインAの過剰発現で速筋タイプの筋細胞が出現

マウスの下肢腓腹筋を摘出し、横断切片を作成したうえで、速筋細胞のマーカー分子(MHC-II)を検出する免疫染色を行った。楕円形に見えるのが筋細胞の横断面で、白く抜けているのが速筋タイプの筋細胞。黒く見えるのが遅筋タイプの筋細胞。速筋タイプの筋細胞は、右側写真の過剰発現マウスのみで観察された。

筋力を増強させる調節因子を見出した可能性を示唆している。

(B) 肝臓の蓄積脂肪が減少 (図 2); 組織病理検査を行ったところ、マイオカイン A 過剰発現マウスでは、肝臓への脂肪蓄積量が減少していることが明らかになった (図 2)。さらに、肝臓の脂肪滴のサイズが、正常マウスと比較して有意に小さかった。脂肪滴が小さいと、体積に対する表面積の比率が高まるため、脂肪が消費されやすいことを示唆する。

### (2) R-spondin 3

骨格筋の細胞には、収縮力は弱いものの疲労耐性の高い Type1 細胞 (マラソン・タイプ) と、収縮力は強いが容易に疲労する Type2 細胞 (スプリント・タイプ) の、2 種類がある。遺伝子組み換え操作によって、蛍光下で Type1 細胞のみがシアン色に光るようにマウスを作製し、Type1 細胞にのみ高発現するマイオカイン遺伝子を探したところ、R-spondin 3 が同定された。R-spondin 3 の生理作用を明らかにするため、筋幹細胞 (現状は筋細胞ではないが、将来筋細胞へと分化する潜在力を有する幹細胞で、骨格筋細胞の膜表面に局在) に R-spondin 3 を添加して分化誘導した。すると、筋幹細胞の由来が Type1 細胞表面であれ Type2 細胞表面であれ、Type1 細胞の主構成分子であるミオシン重鎖 1 の発現が強く誘導された (図 2)。これに対して、Type2 細胞の主要構成分子であるミオシン重鎖 2 の発現に変化は認められなかった。この結果は、R-spondin 3 が筋幹細胞を骨格筋 Type1 細胞へと分化誘導させるマイオカインであることを明確に示している。R-spondin 3 が、どのような細胞内シグナル伝達経路を介して、この作用を促しているのかを明らかにするために、薬理的な検討を行った。その結果、3 つの分岐路から構成されている Wnt シグナリング経路のなかの、Wnt/-catenin 経路を活性化して、Type1 細胞化を促進していることが明らかになった。生体内において骨格筋細胞は、非常に高い再生能力を有する。そのため筋組織が、物理的・化学的要因によって障害を受けても、数週間で再生する。まだ未解明の理由で、培養細胞などの生体外実験ではその再生力を再現できないため、骨格筋特異的かつ成長時期特異的に R-spondin 3 を欠損させた遺伝子組み換えマウスを作製した。野生型マウスおよび欠損マウスのいずれにおいても、化学的筋損傷を付加した 2 週間後には、筋組織の再生が認められた。しかし、欠損マウスにおいては、再生した組織に占める Type1 細胞の比率が、野生型マウスのそれに比較して有意に少なかった。これらの発見は、R-spondin 3 が Type1 細胞の誘導因子であることを示している。

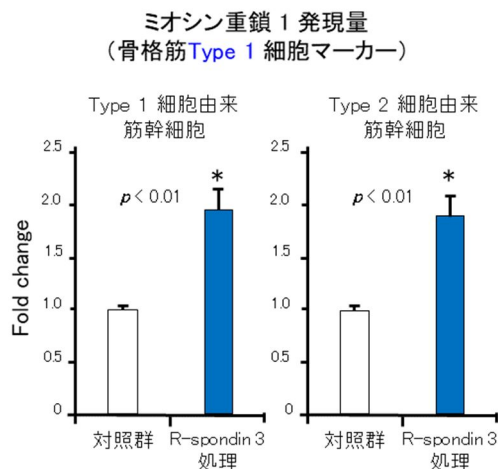


図2 R-spondin 3は筋幹細胞をType1骨格筋細胞へと分化誘導する

### (3) 血小板由来成長因子 (PDGF)

マウスの筋サテライト細胞由来の筋芽細胞および分化させた筋管細胞から PDGF が分泌されるか確認したところ、主に筋管細胞から分泌されることが明らかとなった。そこで、リコンビナント PDGF を筋芽細胞に添加し、増殖能を解析したところ、有意に筋芽細胞の増殖が促進した。さらに、PDGF を添加した筋管細胞は、筋量の指標である筋管径、ミオシン重鎖の発現量、および筋収縮力の有意な増大が認められた。すなわち、PDGF は筋管細胞から分泌され、筋芽細胞の増殖および筋管細胞の成熟を促進させることが明らかとなった。そこで、PDGF が細胞の増殖や成熟促進を誘導する細胞内シグナル伝達に関与しているか検証したところ、筋芽細胞と筋管細胞に共通して AKT/p70S6K、MAP Kinase、および STAT 経路を活性化させることが明らかとなった。以上のことから、PDGF は筋芽細胞と筋管細胞に作用し、筋再生や筋の肥大において重要な役割を有すると考えられる。骨格筋特異的かつ成長時期特異的に PDGF を欠損させた遺伝子組み換えマウスの解析は進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Goto-Inoue Naoko, Morisasa Mizuki, Kimura Keisuke, Mori Tsukasa, Furuichi Yasuro, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L	4. 巻 in press
2. 論文標題 Mass spectrometry imaging reveals local metabolic changes in skeletal muscle due to chronic training	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mita Yoshitaka, Ito Miyuki, Yamada Mio, Fujii Nobuharu L., Manabe Yasuko, Furuichi Yasuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of chronic muscle contraction on expression of contractile and metabolic proteins in mouse primary cultured myotubes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 51～56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7600/jpfsm.11.51	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furuichi Y, Kawabata Y, Aoki M, Mita Y, Fujii NL, Manabe Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Excess Glucose Impedes the Proliferation of Skeletal Muscle Satellite Cells Under Adherent Culture Conditions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 640399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.640399.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tamura K, Goto-Inoue N, Miyata K, Furuichi Y, Fujii NL, Manabe Y.	4. 巻 15(8)
2. 論文標題 Effect of treatment with conditioned media derived from C2C12 myotube on adipogenesis and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0237095.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0237095.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Kenichi, Furuichi Yasuro, Yamamoto Masashi, Takahashi Megumi, Akimoto Yoshihiro, Ishikawa Takahiro, Shimizu Takahiko, Fujimoto Masanori, Takada Watanabe Aki, Hayashi Aiko, Mita Yoshitaka, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L, Ishibashi Ryoichi, Maezawa Yoshiro, Betsholtz Christer, Yokote Koutaro, Takemoto Minoru	4. 巻 20
2. 論文標題 R3hdm1 regulates satellite cell proliferation and differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201947957	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Satoko, Nomura Mitsuru, Yamana Ikko, Uchiyama Akira, Furuichi Yasuro, Manabe Yasuko, Fujii Nobuharu L.	4. 巻 83
2. 論文標題 A new in vitro muscle contraction model and its application for analysis of mTORC1 signaling in combination with contraction and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate administration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1851 ~ 1857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1625261	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 眞鍋康子, 濱口裕貴, 松井翼, 出口真次, 古市泰郎, 藤井宣晴
2. 発表標題 骨格筋を多角的視点から考える」 - 骨格筋培養細胞の収縮力評価法の開発とその応用-
3. 学会等名 日本農芸化学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞鍋康子, 三田佳貴, 古市泰郎, 藤井宣晴
2. 発表標題 マイオカインの最前線
3. 学会等名 日本栄養食糧学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井宣晴
2. 発表標題 マイオカイン研究の歴史と現状
3. 学会等名 日本運動生理学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古市泰郎, 三田佳貴, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 骨格筋の「質」を制御するマイオカイン
3. 学会等名 日本体力医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古市泰郎, 川端有紀, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 筋幹細胞の増殖におけるグルコースの意義
3. 学会等名 日本筋学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井宣晴
2. 発表標題 マイオカインを運動療法に利用するための方策
3. 学会等名 第54回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井宣晴, 古市泰郎, 眞鍋康子
2. 発表標題 マイオカインと骨格筋分子生物学
3. 学会等名 第42回日本糖尿病学会, (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 湯、小宮祐希、市田日和、三浦進司、古市泰郎、藤井宣晴、眞鍋康子
2. 発表標題 骨格筋に発現する分子Xは肝臓の脂質制御に作用する
3. 学会等名 第75回日本体力医学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三田佳貴、朱浩男、古市泰郎、藤井宣晴、眞鍋康子
2. 発表標題 遅筋線維特異的に発現するマイオカインが筋サテライト細胞に与える影響について
3. 学会等名 第75回日本体力医学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古市泰郎、川端有紀、青木美穂、眞鍋康子、藤井宣晴
2. 発表標題 高グルコースは骨格筋幹細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨格筋 T y p e I 細胞への分化誘導剤	発明者 藤井宣晴, 眞鍋康子, 古市泰郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022- 60451	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東京都立大学 運動分子生物学研究室 <a href="https://www.comp.tmu.ac.jp/muscle/">https://www.comp.tmu.ac.jp/muscle/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	出口 真次  (Deguchi Shinji)  (30379713)	大阪大学・基礎工学研究科・教授   (14401)	
研究分担者	古市 泰郎  (Furuichi Yasuro)  (40733035)	東京都立大学・人間健康科学研究科・助教   (22604)	
研究分担者	眞鍋 康子  (Manabe Yasuko)  (60467412)	東京都立大学・人間健康科学研究科・准教授   (22604)	
研究分担者	中川 嘉  (Nakagawa Yoshimi)  (80361351)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授   (13201)	



7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------